

科学研究費助成事業 研究成果報告書

平成 29 年 6 月 28 日現在

機関番号：32669

研究種目：基盤研究(C) (一般)

研究期間：2014～2016

課題番号：26450435

研究課題名(和文)肥満犬猫における脂質過酸化マーカーの診断的意義に関する研究

研究課題名(英文) Study on the diagnostic significance of lipid peroxidation markers in obese dogs and cats

研究代表者

森 伸子 (Mori, Nobuko)

日本獣医生命科学大学・獣医学部・研究員

研究者番号：10644536

交付決定額(研究期間全体)：(直接経費) 2,100,000円

研究成果の概要(和文)：犬猫の肥満を適切に評価するには、「蓄積脂質の量的指標」から「蓄積脂質の質的指標」へと進化させる必要があると考え、脂質過酸化マーカーを中心とした新しいマーカーの確立を試みた。内因性の抗脂質過酸化酵素であるPON-1は、健常犬において、より粒子径の小さいHDLと相関があることがわかった。また、酸化LDLに関しては、犬猫の肥満との関連性は低いが、肥満群の中に数頭高値を示すものがあり、病気の前兆を示す有力な候補である可能性が高まった。また肥満猫のボタンパク質コレステロールの吸収系と合成系においては、合成系コレステロールが優位に高いことも分かった。

研究成果の概要(英文)：In order to properly evaluate the obesity of dogs and cats, it is necessary to evolve from the "quantitative indicator of accumulated lipids" to "qualitative index of accumulated lipids", focusing on lipid peroxidation marker I try to establish as a new marker. In dogs and cats, both paraoxinase activity and allyl esterase activity of paraoxinase (PON-1) could be measured. It was found that PON-1, an endogenous anti-lipid peroxidase, correlated with smaller particle size HDL cholesterol in normal dogs. Regarding oxidized LDL, there is a low relevance to dog and cat obesity, but some of obesity group showed several highs, and the possibility that it will be a useful marker showing symptoms of some disease has increased. It was also found that synthetic cholesterol is trend to be higher than in the absorption cholesterol in obesity cat's protein cholesterol.

研究分野：脂質代謝

キーワード：肥満 犬 猫 脂質過酸化マーカー

1. 研究開始当初の背景

諸外国では、犬猫の肥満が深刻化し、調査・研究が進められてきた。日本と海外では、飼育環境（特に運動量）や人気品種が異なるが、日本の臨床獣医師達も諸外国同様に肥満犬猫が増加傾向であることを感じていた。しかし、犬猫の肥満を診療・予防するという意識はまだ浸透しておらず、食事を改善する程度のアドバイスにとどまっているのが現状であった。

日本における犬猫の肥満拡大を放置することは、各種代謝疾患（糖尿病、高脂血症など）の発症増加につながることも予測され、まず一般的な指標による大規模な犬の肥満率を調査することにした。2013年、約1000頭を超える犬の血液生化学検査とボディコンディションスコア（BCS）評価を行い、結果、日本の約27%の飼育犬が肥満していることを明らかにした。肥満の指標として用いた蓄積脂質の量的指標（体重、BCS）は、有用ではあったが、犬猫特有の課題も明らかとなった。例えば、品種による体型、被毛の違い、犬猫特有の脂質代謝メカニズム（犬猫は高HDL動物で、ヒトは高LDL動物）、若年時の去勢・避妊による代謝変化などがあった。ゆえに、ヒトの肥満の指標をそのまま用いることが難しいことが明らかとなり、独自の指標の必要性が望まれていた。

2. 研究の目的

犬猫の肥満を評価するには、今までの「蓄積脂質の量的指標」から「蓄積脂質の質的指標」へと進化させることにより、特有の課題を解決する糸口になり、新たな肥満指標として運用できる可能性はないかと考えた。そこで、以下の3点を目的として研究を開始した。

内因性の「抗脂質過酸化酵素」に着目し、肥満の際に増減するリポ蛋白質コレステロールプロファイルとの関連性を検証し、新肥満指標（病的前兆の肥満）としての可能性を探ることとした。

ヒトでは動脈硬化の要因と考えられているLDLであるが、高HDL動物である犬猫は量的にはヒトほど多くなく、問題視されていない。しかし、犬猫にも動脈硬化の報告はあり、ヒト同様に犬猫にも高齢化が進んでいるにもかかわらず、脂質の劣化を示す酸化LDLについての知見は報告されていない。そこで、酸化LDLについて、まずは犬猫で定量が可能かどうか試み、健康な犬猫において酸化LDL濃度の正常範囲を示し、肥満が酸化LDL

の濃度にどのように影響しているかを評価することとした。

動物病院に来院する機会が犬よりも少ない猫については、肥満についての研究も犬よりもさらに進んでいない。そこでまずは現状の日本において、猫の肥満がどの程度拡大しているか、広範囲調査研究を行うこととし、またその傾向を分析することにした。

3. 研究の方法

「抗脂質過酸化酵素」と細分化リポタンパク質コレステロールについて

健常犬10頭、肥満犬10頭、健常猫10頭、肥満猫10頭 総計40頭を対象として、HPLCを用いてリポタンパク質コレステロールを分画した。一般的なリポタンパク質コレステロールの主要4分画、さらに詳細な21分画に分画し、肥満群と健常群での相違を検証した。併せて、内因性の抗脂質過酸化酵素として、パラオキシナーゼ（PON-1）に注目し、PON-1の酵素活性測定と21分画のリポ蛋白質コレステロールとの関連性を検証した。PON-1は複数の異なる酵素活性（パラオキシナーゼ活性、アリルエステラーゼ活性、ホモシステインチオラクトナーゼ活性）を持っている。犬猫のPON-1測定に関しては、報告は少なく、いずれの活性が最も有用であるかは明確になっていない。犬猫のPON-1の測定とその指標的価値に関して、先行して研究を進めているスペインムルシア大学のセロン教授に意見仰ぎ、測定・検証を行った。

また、リポタンパク質コレステロールに関しては、比重・粒子径という側面からだけでなく、主要な合成系コレステロール（ラソステロール、デスモステロール）と吸収系コレステロール（β-シトステロール、カンペステロール）に着目し、ガスクロマトグラフィーで測定、猫の健常群と肥満群におけるその相違を検証した。

□酸化LDLの定量と肥満との関連性の検証

新たに29頭の猫、19頭の犬の血漿検体を用いて、ELISA法による酸化LDLの定量を試みた。全ての対象動物を5段階のBCS3、BCS4、BCS5の3群に分け、血液生化学項目、MDA、酸化LDLを測定・比較した。ヒト血清のアガロースゲル電気泳動の場合、LDLの泳動位置はLDL粒子の荷電によって決まり、LDLは酸化や糖化などの変性を受けると、アポB100の陰性荷電が増すと考えられている。つまり、LDL分画が正常検体に比べて陽極にシフトしている時は、LDLが何らか

の変性を受けていると考えられる。そこで、犬猫における酸化 LDL の定量結果と電気泳動の LDL 相対移動度も比較・検証した。

日本における猫の肥満率とその傾向

東京、茨城、千葉、大阪、福岡の 18 の動物病院に協力を仰ぎ、約 220 頭の猫の血漿検体とプロファイルを集めた。全ての猫は担当獣医師により、健康診断がなされ BCS5 段階評価をされた。27 頭の猫は、臨床徴候と以前の血液検査から肝障害、腎不全、糖尿病などの症状が見られたので、今回の肥満検証の母集団から除外した。その結果、190 頭（雌 89 頭、雄 101、年齢、0.6~19 歳）の猫を今回の母集団として、肥満について分析することにした。品種は、アビシニアン（雌（F）n = 3、雄（M）n = 3）、アメリカンショートヘア（F-7、M-15）、チンチラ（F-3、M-2）、日本猫（F-1、M-2）、スコティッシュフォールド（F-1、M-3）、ノルウェイジャン（M-3）、ペルシャ（M-1）、エジプシャンマウ（F-1、M-1）、エキゾチックショートヘア（M-1）、ボブテール（M-2）、メインクーン（M）、オシキャット（F-1、M-1）、ロシアンブルー（M-2）、セルカークレックス（M-1）、シャム（F-1、M-1）、ミックス（F-38、M-37）、不明（F-11、M-10）という内訳である。

全ての猫の血液検体を同一方法・測定機器を用いて、血液生化学検査、遊離脂肪酸、インスリン、アディポネクチンを測定した。統計処理として回帰分析を行い、年齢、BCS、および性別の血漿分析への影響を検証した。統計学的有意性は、Kruskal-Wallis 多重比較 ANOVA（Dunn method）によって決定した。

4. 研究成果

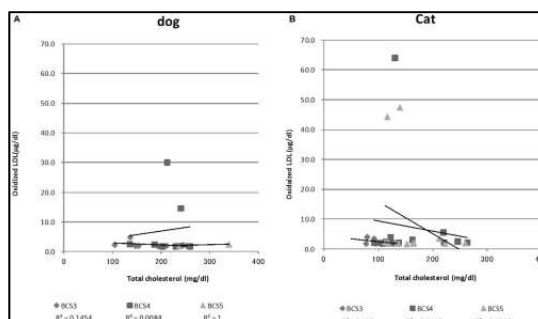
犬猫の PON-1 については、パラオキシナーゼ活性、アリルエステラーゼ活性で、酵素活性を測定することが可能であった。特に健康犬群において顕著な傾向が見られた。健康犬群の両活性の PON-1 とともに、4 分画の HDL リポタンパク質コレステロールと高い相関性を示し、かつ細分化した HDL リポタンパク質コレステロールの 5 細分画（very large、large、medium、small、very small）においては、より粒子径が小さい HDL と高い相関性を示した。一方で、肥満犬群に関してはその傾向は示さず、いずれの分画においても相関性が見られなかった。

リポタンパク質コレステロールの吸収系と合成系コレステロール測定では、肥満群猫が健康群猫と比較して、総コレステロールにお

ける合成系コレステロールの割合が有意に高値を示していることが明らかとなった。吸収系コレステロールに関しては、その傾向は見られなかった。

現在、抗脂質過酸化酵素と細分化リポタンパク質コレステロールについての分析をまとめた論文については、雑誌投稿中である。

酸化 LDL 定量の結果、犬における BCS3 群の酸化 LDL 値は平均 2.4 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (± 0.9)、猫における BCS3 の酸化 LDL 値も 2.5 $\mu\text{g}/\text{dl}$ (± 0.9) とほぼ等しかった。これらの値は、健康なヒトの酸化 LDL の約 4 分の 1 程度であった。犬は BCS4 で、酸化 LDL の高値を示したが、有意差はなく、BCS5 に関しては、BCS3 よりも低値を示した。猫は、BCS4、BCS5 と上昇傾向が見られた。犬猫いずれも、BCS 群における総コレステロール濃度に関しては有意な差が見られたものの、酸化 LDL については、有意差は見られないという結果であった。総コレステロール濃度と酸化 LDL との相関も明らかな傾向を示さなかった。つまり、犬猫の肥満と LDL の酸化との関連性は高くないことが明らかとなった。



しかし、BCS 別で酸化 LDL と総コレステロール濃度で、全対象動物をプロットしてみると、犬でも猫でも、肥満しているものの中（BCS4、BCS5）で数頭、酸化 LDL 値が高いものが存在していた（上記図）。これらは、疾病の前兆とも考えられ、高酸化 LDL を示した対象については、さらに経時的調査をしていく必要性が明らかとなった。

アガロースゲル電気泳動における LDL 相対移動度と酸化 LDL 量に関しては、連動する結果は得られなかった。犬猫の少ない LDL の変性を見るには、より詳細に分画できる手法の選択が必要と思われた。この論文は、Frontiers in veterinary Science に掲載された。（Preliminary analysis of modified low density lipoproteins in the serum of healthy and obese dogs and cats. 2015. 2:34）

約 190 頭の日本で飼育されている猫の肥満率を調べたところ過体重および肥満猫（>BCS3）の割合は約 56%であり、肥満猫

(>BCS4) は約 42%であることがわかった。

また、加齢は脂質代謝および腎臓障害を発症する危険性を増加させ、BCS および年齢の上昇は両方とも、インスリン抵抗性の発症リスクの増加をもたらすことも明らかとなった。さらに、BCS のスコア増加は、高コレステロールおよびトリグリセリド脂質血症の発症をもたらす可能性があり、より高いレベルの遊離脂肪酸を伴うことも分かった。そして、性別では、雄が雌より高いインスリン値、低いアディポネクチン値に加えて、より高い BCS および体重値を示していることが明らかとなった。日本における猫の肥満率とその分析の論文は、*Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences* に掲載された。(Overall prevalence of feline overweight/obesity in Japan as determined from a cross-sectional sample pool of healthy veterinary clinic-visiting cats in Japan. 2016. 40:304-312)

5 . 主な発表論文等

(研究代表者、研究分担者及び連携研究者には下線)

〔雑誌論文〕(計 14 件)

1. Age effects on plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations in dogs. Kawasumi K, Kashiwado N, Okada Y, Sawamura M, Sasaki Y, Iwazaki E, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *BMC Veterinary Research*. 2014. 5; 10: 57

2. Comparison of plasma lipoprotein profiles and malondialdehyde between hyperlipidemia dogs with/without treatment. Li G, Kawasumi K, Okada Y, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T, Mori N. *BMC Veterinary Research*. 2014. 14; 10:67

3. Changes in Different Insulin Sensitive Tissues Gene Expression of Cat Fed on High-fat Diet. Li G, Lee P, Okada Y, Yamamoto I, Arai T, Mori N. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2014. 9(5): 270-280

4. Effects of Administration of Licorice Flavonoid Supplement on Lipid Metabolism in Obese Dogs. Kawasumi K, Okada Y, Kashiwado N, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2014. 9(11): 721-726

5. Preliminary analysis of modified low density lipoproteins in the serum of

healthy and obese dogs and cats. Mori N, Okada Y, Tsuchida N, Hatano Y, Habara M, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T. *Frontiers in veterinary Science*. 2015. 2:34.

6. Molecular characterization of dog and cat p65 subunits of NF-kappaB. Ishikawa S, Takemitsu H, Li G, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *Research in Veterinary Science*. 2015. 99:145-8

7. Changes in Malate Dehydrogenase, Lactate Dehydrogenase and M/L Ratio as Energy Metabolism Markers of Acute Weight Gain. Okada Y, Kawasumi K, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2015.10(3): 132-140

8. Identification of free fatty acid receptors GPR40/FFAR1 and GPR120/FFAR4 in a domestic cat. Habara M, Tamanuki M, Ishikawa S, Takemitsu H, Mori N, Okada Y, Nakao N, Kawasumi K, Ishioka K, Arai T. *Asian Journal of Animal and Veterinary Advances*. 2015.10 (4): 185-190

9. Sirtuin 1 suppresses nuclear factor κB induced transactivation and pro-inflammatory cytokine expression in cat fibroblast cells. Ishikawa, Takemitsu H, Habara M, Mori N, Yamamoto I, Arai T. *Journal of Veterinary Medical Science Advance Publications*. 2015. 77(12): 1681–1684.

10. Changes in fatty acid composition in tissue and serum of obese cats fed a high fat diet. Fujiwara M, Mori N, Sato T, Tazaki H, Ishikawa S, I Yamamoto I, Arai T. *BMC Veterinary Research*. 2015.13; 11 (1):200.

11. Overall prevalence of feline overweight/obesity in Japan as determined from a cross-sectional sample pool of healthy veterinary clinic-visiting cats in Japan. Mori N, Iwasaki E, Lee P, Okada Y, Kawasumi K, Arai T. *Turkish Journal of Veterinary and Animal Sciences*. 2016. 40:304-312

12. 新井敏郎・森伸子・岡田ゆう紀 2016 アディポネクチンを用いたメタボリックシンドロームの診断基準 info vets No.180 120-122

13. 森伸子 2016 肥満の血液マーカーの探索 J-vets No29 36 - 4

14. 岡田ゆう紀・森伸子・澤村昌樹・川角浩・小林元郎・新井敏郎 2016 猫のメタボリックシンドローム 獣医生命科学 2;1-6

〔学会発表〕(計8件)

1. Changes in plasma lipoprotein profiles and malondialdehyde concentrations in hyperlipidemia dogs. Mori N, Li G, Kashiwado N, Kawasumi K, Okada Y, Ishikawa S, Yamamoto I, Arai T. 15th International Society for Animal Clinical Pathology. コペンハーゲン(デンマーク) 20140625-20140629

2. 猫の肥満発症のメカニズムの特性と早期診断法の開発 森伸子 日本臨床病理学会 2014 年次大会 日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市) 20140531-20140601

3. Comparison of plasma cholesterol and triglyceride profiles and metabolite concentrations between aged dogs and young dogs. Okada Y, Kawasumi Y, Kashiwado N, Mori N, Yamamoto I, Arai T. 第1回 日本獣医生命科学学会 日本獣医生命科学大学(東京都武蔵野市) 20141109

4. イヌおよびネコ NF- κ Bp65 サブユニットの機能解析と Sirtuin1 の影響 石川真悟、羽原誠、武光浩史、森伸子、山本一郎、新井敏郎 第157回 日本獣医学会 北海道大学(北海道札幌市) 20140909-20140912

5. イヌとネコにおける脂肪酸受容体 GPR120 の cDNA クローニングおよび各組織における mRNA 発現量の解析 羽原誠、石川真悟、李格賓、武光浩史、岡田ゆう紀、森伸子、川角浩、山本一郎、新井敏郎 第157回 日本獣医学会 北海道大学(北海道札幌市) 20140909-20140912

6. The effect of Gravonoid on dog lipid metabolism. 森伸子 第55回日本伝統獣医学会大会 ロイトン札幌、ホテルさっぽろ芸文館(北海道札幌市) 20150607-20150608

7. cDNA Cloning and mRNA Expression of cat melanocortin 4 receptor. M Habara, M Tabuchi, Y Okada, N Mori, K Kawasumi, T Arai, I Yamamoto. 16th International Society for Animal Clinical Pathology. ケープタウン(南アフリカ) 20160405-20160409

8. Novel definition of obesity: pathological weight gain in cat. Y Okada, K Kawasumi, N Mori, I Yamamoto, T Arai. 16th

International Society for Animal Clinical Pathology. ケープタウン(南アフリカ) 20160405-20160409

〔図書〕(計0件)

〔産業財産権〕

出願状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
出願年月日:
国内外の別:

取得状況(計0件)

名称:
発明者:
権利者:
種類:
番号:
取得年月日:
国内外の別:

〔その他〕
ホームページ等

なし

6. 研究組織
(1)研究代表者
日本獣医生命科学大学・獣医学部・研究員
森 伸子(MORI Nobuko)
研究者番号:10644536

(2)研究分担者
なし()

(3)連携研究者
新井 敏郎(ARAI Toshiro)
日本獣医生命科学大学・獣医学部・教授
研究者番号:70184257

(4)研究協力者
なし()